

国立感染症研究所長
脇田 隆宇 殿

BSL2 チフス菌実験室への臨時立入査察を踏まえた改善について

実験従事者の腸チフス罹患事案について、当委員会において臨時立入査察を行った結果、別紙のとおり改善が必要であると考えられる事項が見受けられましたので報告します。

令和5年9月12日

国立感染症研究所病原体等取扱安全監視委員会委員長
久枝 一

立入査察結果

国立感染症研究所戸山庁舎 02-047 BSL2 実験室 チフス菌取扱エリア

項 目	指 摘 事 項
総 括	病原体の取扱いに関しては、改善が必要な実験室の運用状況が確認されました。指導すべき事項としては別紙1のとおりです。
健 康 管 理	取扱病原体について、発症時の症状を把握しておく必要があります。
安 全 管 理	実験室の安全管理について指導すべき事項については別紙1のとおりです。
施 設 利 用	実験室の利用方法について指導すべき事項については別紙1のとおりです。

指 導 事 項

【戸山庁舎 02-047 BSL2 実験室 チフス菌取扱エリア】

施設設備関係

指導事項なし

運用方法

PPE の種類、着脱方法、手洗い、整理整頓

- ・検査方法のマニュアルは存在するが、検査手順に合わせた PPE の脱着方法や除染方法を記載したマニュアルが作成されていなかった。

病原体取扱エリアの適切なゾーニング

- ・病原体取扱エリアを明確に分けるべきであるのに安全キャビネットのすぐ横に PC が設置されていた。
- ・床などは清掃・消毒が容易な状態にしておくべきであるのに、資材が床に直置きになっていた。

緊急時（曝露時、盗難時、火災時、その他災害時等）の対応法

- ・BSL2 の緊急時連絡網がなかった。

病原体等の消毒・滅菌方法

- ・有効期限が限られている消毒用アルコールの管理方法が不適切であった。
- ・作業後に菌が付着しそうな箇所を消毒するような取組がなかった。

その他

- ・特定四種病原体等取扱 BSL2 実験に関して内部あるいは外部監査がなかった。

セキュリティ

指導事項なし

その他

特記事項なし

総 括

通常、実験従事者が曝露した場合、実験従事者（あるいは関係者）が曝露事故発生を報告して、曝露小委員会の聞き取りを受けて、病原体等取扱安全監視委員会が調査を実施するが、今回は本人の認識がない状態で腸チフスを発症し、保健所からの連絡にて判明している。今回はその点を踏まえて実験従事者（患者）からの聞き取り情報や実験室の状況を査察し、実験室内での曝露事故の可能性を検証した。

前述の立入検査結果、および当該実験室で使用されたチフス菌対照株と患者から採取した試験株についてゲノム解析を行った結果（別紙2）を考慮すると、本委員会としては実験室内曝露があったと判断するに至った。

実験室内曝露が発生した原因については、特定することはできなかった。しかし、施設・設備やセキュリティが原因となった可能性は極めて低く、実験室における病原体等の運用方法に原因があったと考えられた。特に、指導事項に記載したように、管理区域内のゾーニングや个人防护具の選択・着脱方法、手指を含む消毒・除染方法などの運用の部分を見直す必要があると考えられた。

現行、感染研 BSL3、BSL4 実験室については当委員会による病原体取扱いに関する年次立入検査を実施しており、さらに特定一、二、三種病原体等取扱実験室については厚生労働省による定期的な立入検査を受けているところであるが、今回対象となった BSL2 エリア内の特定四種病原体等取扱実験室については規定上内部および外部の監査を受けていない。また、今回曝露した者は病原体取扱歴が 20 年とベテランの域に達しており、これまでの業務においてヒヤリハットを含めて曝露（疑い）は起こしていない。その様な者が無意識のうちに曝露、発症した事実は極めて深刻であり、当該取扱エリアでの病原体等の取扱を含む運用方法を取扱部局で定め、運用再開前に内部および外部監査による確認を行うことが望ましい。また、当該取扱エリアの定期的な監査等も考慮していただきたい。

病原体取扱者は各自が取り扱う病原体の性状・リスク・発症した場合の症状等を再度確認することが求められる。

国立感染症研究所は感染症の制圧や予防を目的とした研究機関であり、そのような施設において曝露事故が発生したことは誠に遺憾であり、国立感染症研究所の信用失墜につながりかねない。

近隣にお住まいの方をはじめ、国民からの信頼を裏切らないためにも、本件のような曝露事故を未然に防げるような対策を国立感染症研究所全体で検討して頂きたい。

なお、今回査察対象となった取扱エリアにおいては、指摘した内容を踏まえた対応策を策定する必要があると考える。特定四種病原体等取扱 BSL2 エリアにおける対応策については、地方自治体や大学をはじめとした感染症等公衆衛生対策に取り組む関係機関へ幅広く周知し、曝露予防を行う必要があると考えられる。

【本事案における課題等】

1. 特定四種病原体等に関して、BSL2 実験室での検査手順に合わせた PPE の着脱方法、除染方法、実験室内における病原体等の移動方法を定めていなかった。
2. 当該実験室の運用方法について監査するシステムが存在しなかった。
3. 実験従事者が明確な曝露事象を認識しておらず、医療機関にて取扱い病原体による感染症であることを知った。

【当該実験室の取扱い等】

1. 当該実験室の再開は、再発を防止するための対策が講じられ、内部および外部の監査を受け、安全面が確認された後に再開する必要がある。

令和5年9月5日

【別紙】

1. 方法

1.1. 供試菌株

対照株は TY230015、TY230016、TY230018～TY230023 の 8 株であった。
試験株は TY230027-1 及び TY230027-2 の 2 株（それぞれ便由来、血液由来）
であった。

表 1. 供試菌株一覧

菌株番号	ファージ型別 実施期間	ファージ型	送付機関	対照株・試 験株
TY230015	7/18-20	E12	A	対照株
TY230016	7/18-20	UVS4	A	対照株
TY230018	7/18-20	DVS	B	対照株
TY230019	7/18-20	DVS	B	対照株
TY230020*	7/31-8/2	UVS4	C	対照株
TY230021*	7/31-8/2	UVS4	C	対照株
TY230022**	7/31-8/2	UVS4	C	対照株
TY230023**	7/31-8/2	UVS4	C	対照株
TY230027-1	—	—	D	試験株
TY230027-2	—	—	D	試験株

*、**：それぞれ家族内事例由来

1.2. 性状確認等

選択培地（DHL 寒天培地）及び非選択培地上における菌株の分離、コロニー
の精製、並びに生化学的性状試験（TSI、LIM 培地）等の確認試験を行った。安
全実験管理部の立ち合いのもと、BSL3 細胞 3 室にて実施した。

1.3. DNA 調製

各菌株を非選択培地上で分離後、緩衝ペプトン水 5mL に培養し、37℃で一晩
静置培養した。培養液を遠心し菌体を回収した。市販キット（DNeasy Blood &
Tissue Kits, Qiagen）を用いて回収した菌体から DNA を抽出、精製した。

菌の培養及びプロテナーゼ K 処理による不活化までの工程を安全実験管理部
の立ち合いの下、BSL3 細胞 3 室にて実施した。

1.4. ゲノム解析

1.4.1. 配列データの取得

QIAseq FX DNA Library Prep Kit (Qiagen) を用い、ライブラリーを作成した。Illumina 社 MiSeq (300 bp x 2) 及び iSeq (150 bp x 2) により配列解読を行った。

1.4.2. データのクオリティチェック

データ量が十分であること、CheckM による完全性、コンタミネーションの確認を行った。(カバレッジ 80 以上、完全性 95%以上、コンタミネーション 2%以下)

1.4.3. データ解析 1

SPAdes によるアセンブリ後、ドラフト配列を Bionumerics に取り込み、Salmonella functional genotyping により、血清型の確認を行った。

1.4.4. データ解析 2

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhi TY2 株の完全長ゲノム (国際塩基配列データベースのアクセッション番号: AE014613.1) を参照配列として解析した。

手法 1: BactSNP によるコアゲノム SNV 抽出→Gubbins による組換え領域の検出・除去→リピート領域及びクラスターSNV の除去→RAxML-NG により系統樹の作成 (ブートストラップ値 1000)

手法 2: snippy によるコアゲノム SNV 抽出→リピート領域除去→Gubbins による組換え領域の検出・除去→RAxML-NG により系統樹の作成 (ブートストラップ値 1000)

手法 3: SPAdes によるアセンブリ→Bionumerics による cgMLST 解析 (3002 遺伝子座を対象) →Minimum spanning tree の作成

結果

性状試験及び取得したドラフトゲノム配列から供試菌株はすべてチフス菌であることが確認された。

以下にゲノム解読データを用いて株間の比較を行った結果を示す。

各手法について、

- A. 参照配列 4,791,961 塩基対中対象となったコアゲノム領域 (%)
- B. 家族内感染であった TY230020 及び TY230021、並びに TY230022 及び TY230023 間の SNVs
- C. B 以外の組み合わせの対照株及び参照株間の SNVs
- D. 試験株 TY230027-1/2 間の SNVs
- E. 試験株 2 株と対照株間の SNVs (TY230018 を除く)
- F. 試験株 2 株と TY230018 間の SNVs

は表 2 に示す通りであった。

表 2. 各手法において検出された SNVs (手法 3 では異なる遺伝子座の数)

	A	B	C	D	E	F
手法 1	90.9	1	66~439	2	335~440	1
手法 2	93.8	1/0	67~452	2	345~453	1
手法 3	—	2/0	43~256	1	211~257	0~1

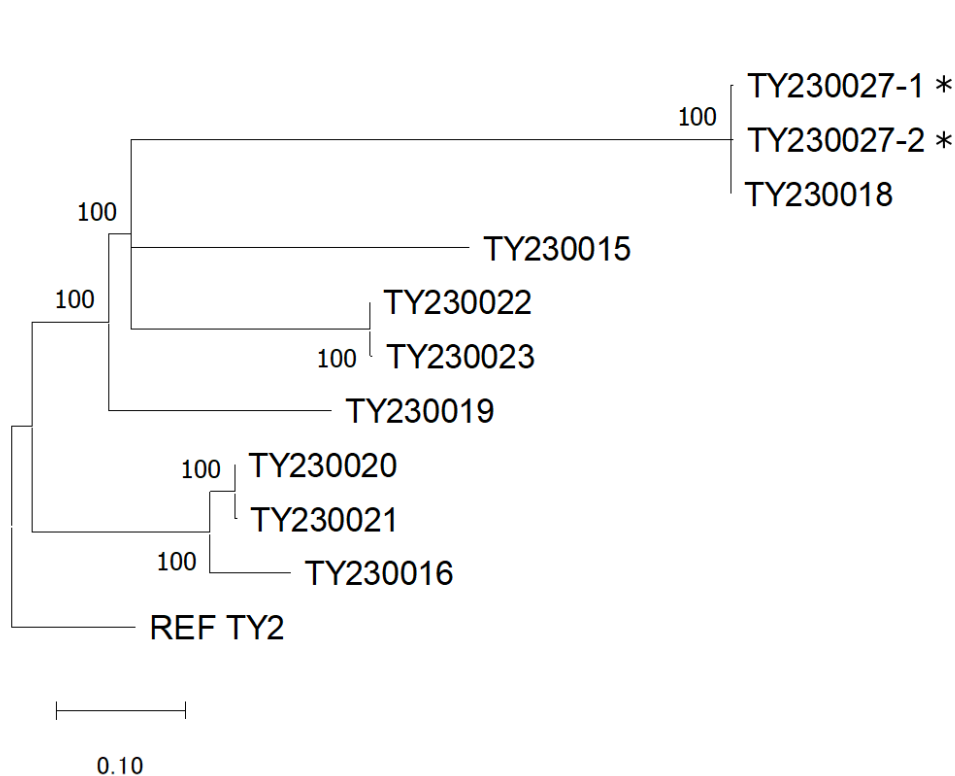


図 1、手法 1 による系統樹 (*、試験株)

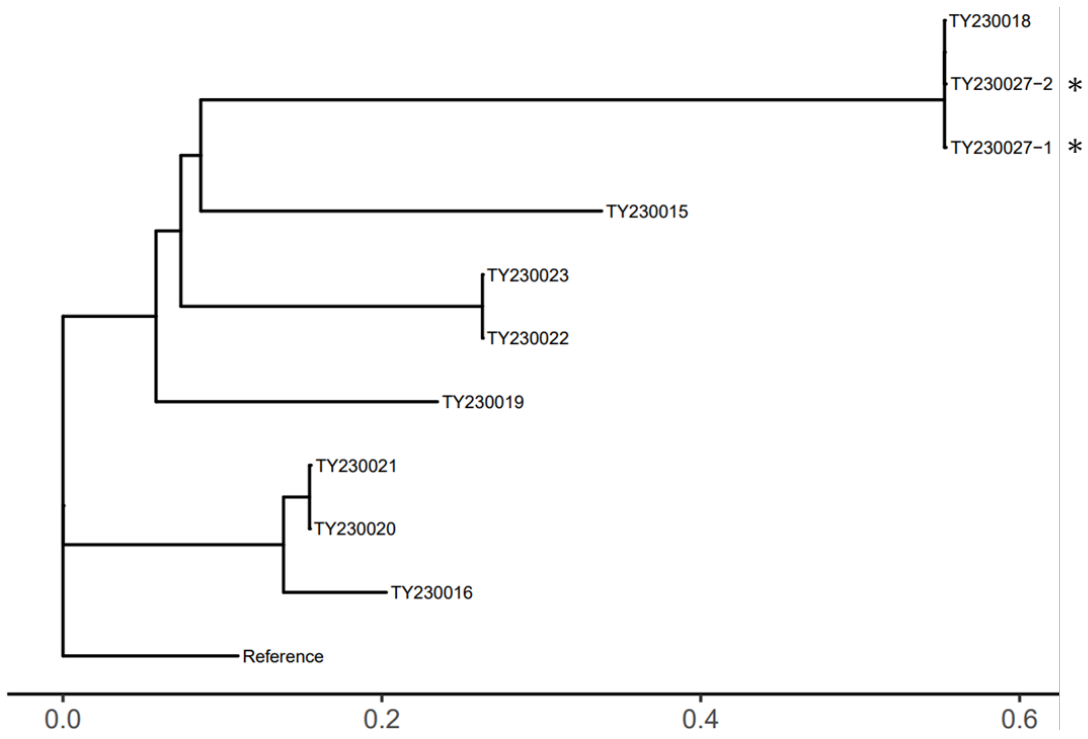


図 2、手法 2 による系統樹 (*、試験株)

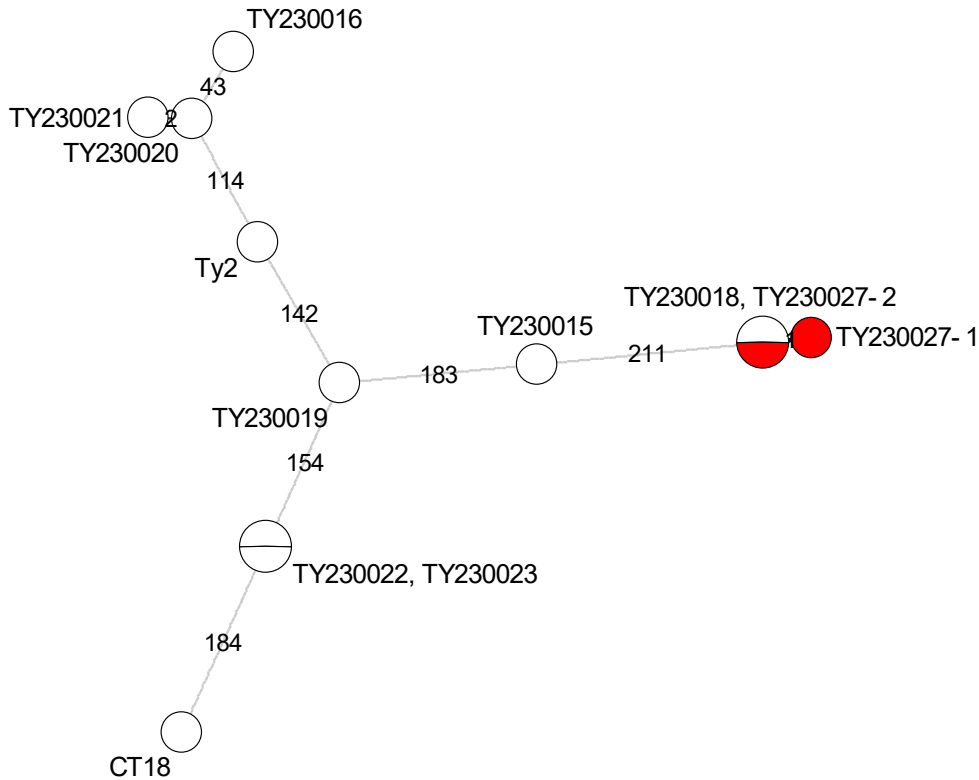


図 3、手法 3 による Minimum spanning tree (赤、試験株)

以上、異なる 3 つの手法によって対照株と試験株の関係性を検討した結果、試験株 TY230027-1 及び TY230027-2 は、対照株のひとつである TY230018 と非常に近縁であると考えられる。

以上

参考データ

試験株のゲノム配列データについて、cgMLST Finder (<http://genomicepidemiology.org/>) を用いてcgMLSTのシークエンスタイプ (ST) を調べた結果、ST 37720が最も近かった。

当該ST株 (図中SAL_8932) 及び類縁株 (cgMLSTが10か所以内の違い、図中「SAL」で始まる株) 25株のデータをデータベース (Enterobase) から取得し、手法1及び手法2によって解析した。その結果、試験株との間のSNVsはそれぞれ、7~21及び7~22であった。図4は手法2による系統樹を示す。

また、手法3では試験株とST37720及びその類縁株との間の遺伝子座の違いは3~9であった (図5)。

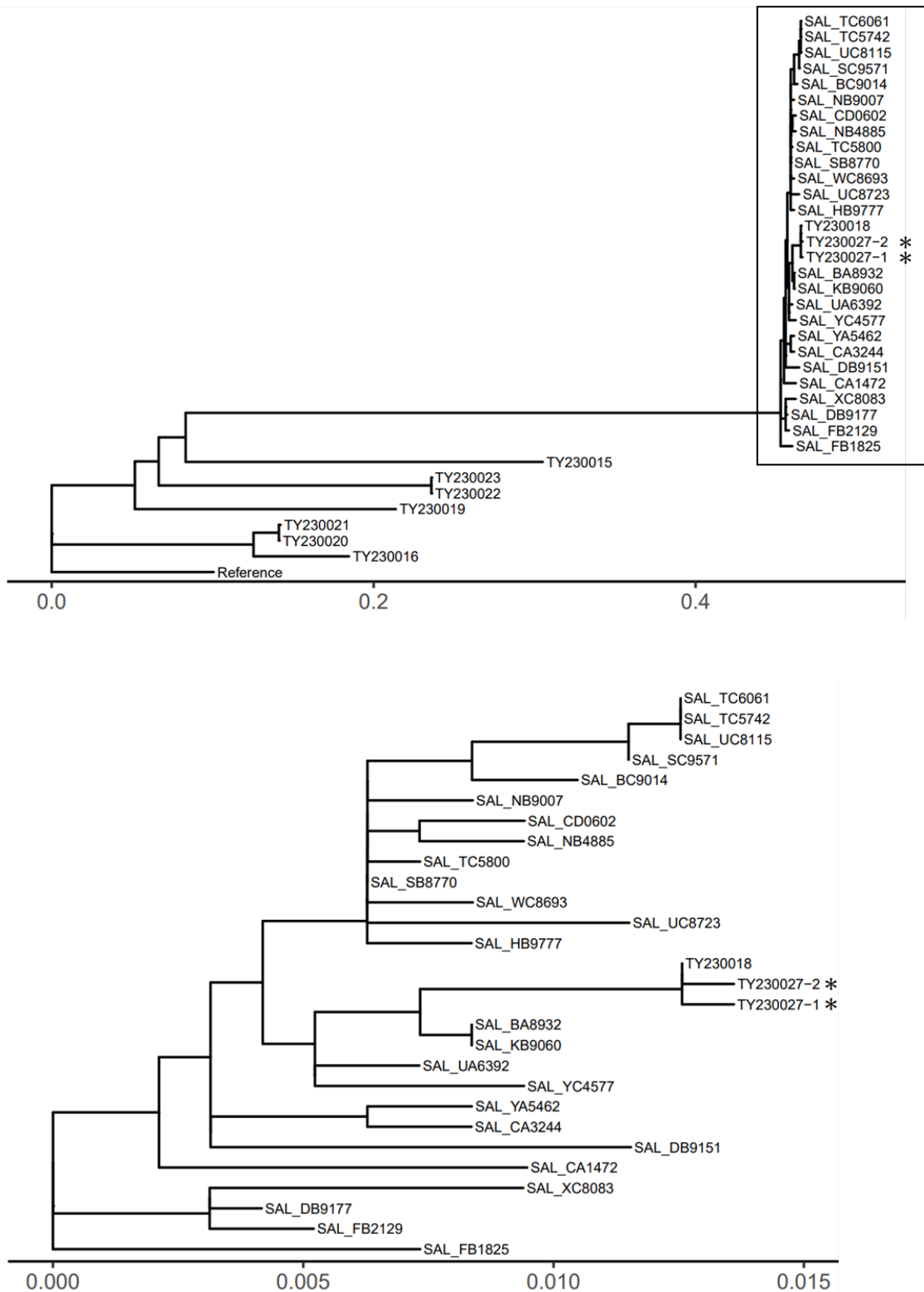


図4、参照株、対照株、試験株及び参考データを含めた系統樹（上）枠線部分の拡大（下）（*、試験株）

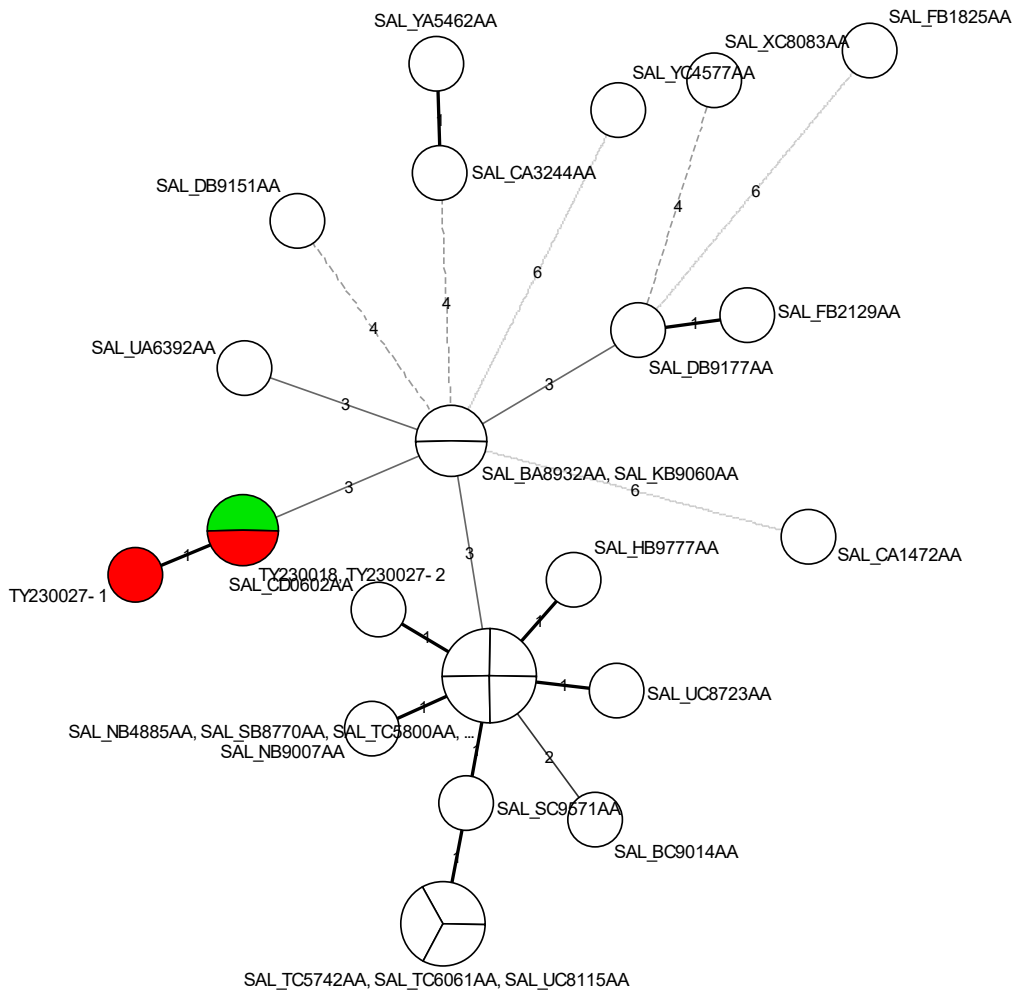


図 5、手法 3 による参考データ及び TY230018 (緑)、試験株 TY230027-1/2 (赤) を用いた Minimum spanning tree